

А. А. Карусевич, Г. Н. Бузук

ПРИМЕНЕНИЕ АЛЮМИНИЯ ОКСИДА ПРИ ОЧИСТКЕ ВОДНО-СПИРТОВОГО ИЗВЛЕЧЕНИЯ ИЗ ЛИСТЬЕВ ЛЕВЗЕИ САФЛОРОВИДНОЙ**Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет**

В ходе валидации методики определения 20-гидроксиэкдизона в листьях левзеи сафлоровидной нами было обнаружено, что проведению анализа мешают сопутствующие вещества, поглощающие в диапазоне длин волн 230–250 нм. Анализ их спектра поглощения позволил предположить, что данные вещества имеют фенольную природу. Для устранения искажающего влияния примесей на результаты количественного определения 20-гидроксиэкдизона была использована твердофазная экстракция на колонках с оксидом алюминия.

Ключевые слова: 20-гидроксиэкдизон, твердофазная экстракция, ВЭЖХ, левзея сафлоровидная.

ВВЕДЕНИЕ

20-гидроксиэкдизон (он же β -экдизон, в дальнейшем – 20Е) – соединение из комплекса полигидроксилированных стероидов, получивших название «экдистероиды» [1, 2].

Экдистероиды являются весьма распространенными стероидными соединениями. Они выявлены более чем у 90% членистоногих и беспозвоночных. В растительном мире они найдены более чем в 80 семействах [3]. Основное содержание при этом приходится на 20Е и α -экдизон. Остальные экдистероиды принято называть минорными.

Содержание 20Е может являться критерием оценки доброкачественности лекарственного сырья [4]. Количество 20Е также может опосредованно служить оценкой фармакологической активности любого лекарственного средства, содержащего экдистероиды [5], поскольку основная доля экдистероидов приходится именно на него [6].

Для количественного определения 20Е применяется как обращенно-фазовый [7, 8], так и нормально-фазовый вариант ВЭЖХ [9, 10].

При разработке (а в дальнейшем и валидации) методики количественного определения 20Е в листьях левзеи сафлоровидной [11] нами было обнаружено, что хроматографический пик 20Е не всегда хорошо разрешается с компонентами матрицы. Кроме того, спектральные характеристики хроматографических пиков 20Е на хроматограммах испытуемых образцов значительно отличаются от спектральных харак-

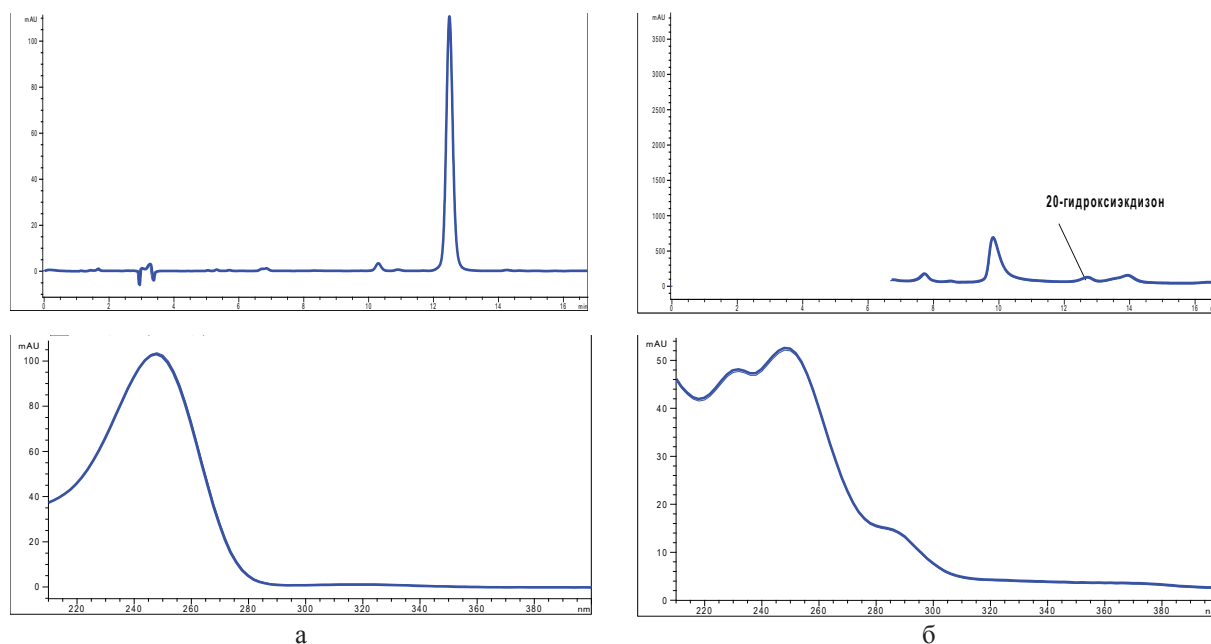
теристик хроматографического пика 20Е на хроматограмме раствора стандартного образца (РСО) (рисунок 1).

На рисунке 1б приведен образец хроматограммы листьев левзеи. Сырье хранили при комнатной температуре в нормальных условиях. В данной хроматограмме выделен пик, наиболее соответствующий образцу 20Е по времени удерживания. Ниже приведен его УФ-спектр.

Наличие посторонних веществ, плохо разрешающихся с хроматографическим пиком 20Е, приводит к возникновению погрешностей. Посторонние вещества маскируют выходные данные пиков; кроме того, содержание мешающих компонентов варьирует в зависимости от сроков заготовки сырья, возраста растения, условий хранения сырья и т.д., то есть является фактором непостоянным. Приведенные ниже спектры (рисунок 2) иллюстрируют некоторые встречающиеся случаи присутствия мешающих агентов.

Нередко примеси встречаются в таком значительном количестве, что совершенно маскируют присутствие 20-гидроксиэкдизона.

Анализ спектра поглощения мешающих веществ позволяет предположить, что данные вещества имеют фенольную природу [12]. Попытка добиться разделения 20-гидроксиэкдизона и примесей путем подбора состава подвижной фазы (ПФ) и режимов хроматографирования (температура, скорость потока подвижной фазы) была успешной лишь отчасти. Поэтому нами было принято решение избавляться от мешающих компонентов матрицы на стадии пробоподготовки.



а – стандартный образец, б – испытуемый образец
Рисунок 1 – Хроматограммы и УФ-спектры растворов
стандартного и испытуемого образцов 20Е

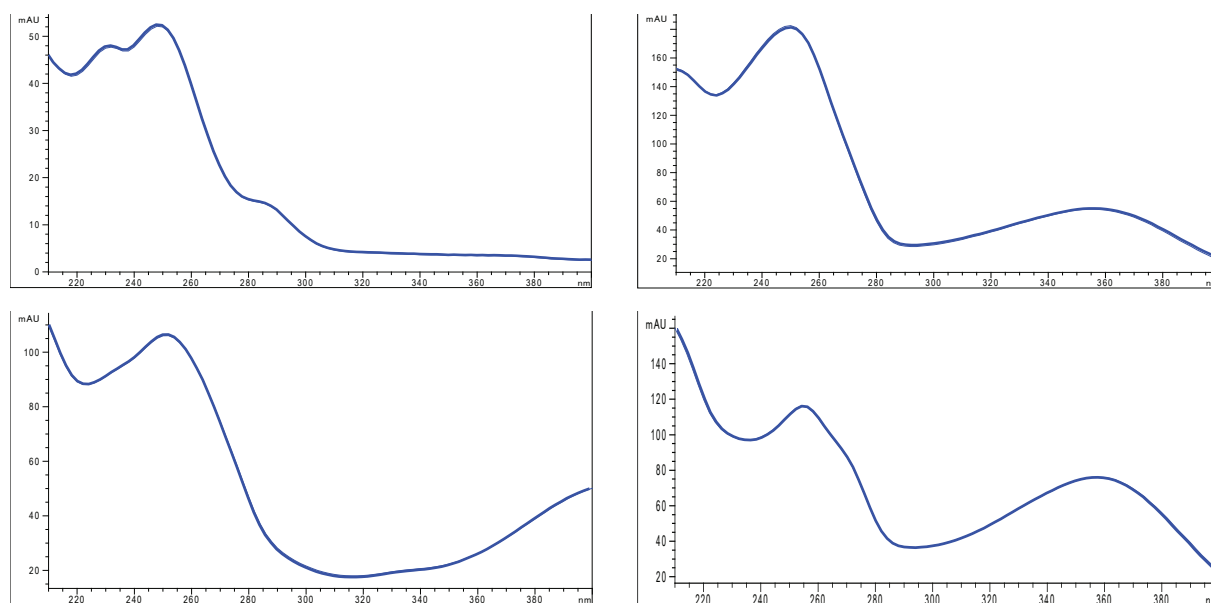


Рисунок 2 – Спектры исследуемых образцов листьев левзеи в области
расположения пика 20Е

Согласно имеющимся данным, оксид алюминия необратимо сорбирует вещества фенольной природы [12], при этом литературных данных о сорбции 20Е нами обнаружено не было. Поэтому это свойство оксида алюминия может быть использовано для очистки водно-спиртовых извлечений лекарственного растительного сырья (ЛРС) от мешающих веществ.

Целью настоящего исследования явля-

ется усовершенствование описанной ранее методики количественного определения 20Е в листьях левзеи сафлоровидной для снижения возможной систематической погрешности, обусловленной наличием фенольных соединений.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

– подобрать состав подвижной фазы и

режим хроматографирования (температура и скорость потока ПФ) для максимального разделения пиков в области поглощения в диапазоне длин волн 230–250 нм;

– определить оптимальное количество оксида алюминия для достижения приемлемых результатов при интерпретации результатов анализа;

– определить степень сорбции 20Е в присутствии компонентов матрицы;

– определить степень сорбции чистого 20Е оксидом алюминия.

В процессе приготовления извлечений из листьев левзеи сафлоровидной, а также РСО, в колонках остается некоторое количество элюента, содержащего 20Е, что может исказить результаты исследования. Поэтому мы посчитали целесообразным определить количество элюента для вытеснения данного остаточного объема.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали ацетонитрил (Sigma-Aldrich, for HPLC), стандартный образец 20Е (Sigma-Aldrich), фильтры «Millipore» с диаметром пор 0,45 и 4,5 мкм.

Для твердофазной экстракции использовался чистый алюминия оксид (Al_2O_3), нейтральный [13].

Работу выполняли на жидкостном хроматографе фирмы Agilent HP 1100, в комплекте с системой подачи и дегазации на четыре растворителя G1311A, диодно-матричным детектором G1315B, термостатом колонок G1316A, устройством для автоматического ввода образцов (автосэмплер) G1313A. Сбор данных, обработка хроматограмм и спектров поглощения проводили с помощью программы Agilent ChemStation for LC 3D.

Разделение проводили на хроматографической колонке Waters Spherisorb ODS-2 250×4,6 мм, размер частиц 5 мкм. Подвижная фаза: вода деионизированная и ацетонитрил 84:16 (по объему), объем пробы 10 мкл, скорость подачи ПФ 0,5 мл/мин. Разделение проводили при температуре колонки 30°C. Детектирование осуществляли при длине волны 247 нм, спектр поглощения в области максимума пика 20Е записывали с помощью фотодиодноматричного детектора Diode-array detector Agilent HP 1100 G1315B и программы Agilent ChemStation for LC 3D.

Определение количества элюента для вытеснения остаточного объема иссле-

дуемого образца в колонке. В стеклянные микроколонки объемом 10,0 мл с впаянным внизу стеклянным фильтром (диаметр пор 16–40 мкм) помещали различные количества оксида алюминия (от 0 до 5000 мг). Каждую микроколонку предварительно взвешивали. Затем колонки с сорбентом кондиционировали путем пропускания 20 мл 70% этанола и снова взвешивали. Разницу в массе ввиду малых количеств элюента не пересчитывали и принимали за остаточный объем.

Приготовление водно-спиртовых извлечений листьев левзеи сафлоровидной. Около 10 г сухих листьев (взвешенных с точностью до 1 мг) левзеи сафлоровидной помещали в коническую колбу вместимостью 200 мл, прибавляли 100 мл 70% этанола, герметично укупоривали и настаивали при периодическом перемешивании в течение суток. После завершения настаивания содержимое колбы процеживали через стеклянный фильтр с диаметром пор 250–500 мкм и дополнительно фильтровали через фильтр с диаметром пор 4,5 мкм.

Приготовление раствора стандартного образца (РСО). Около 0,050 г (точная навеска) 20-гидроксиэкдизона взвешивали в мерной колбе вместимостью 50,0 мл, затем доводили до метки этанолом, 10 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и снова доводили до метки этанолом и фильтровали через фильтр «Millipore» с диаметром пор 0,45 мкм. Полученный раствор использовали в качестве раствора стандартного образца.

Методика определения степени сорбции 20Е оксидом алюминия. В стеклянные микроколонки со встроенным стеклянным фильтром объемом по 10,0 мл помещали различные количества оксида алюминия (от 0 до 5000 мг, с шагом в 500 мг). Сорбент кондиционировали путем пропускания 20 мл 70% этанола.

Через активированные колонки пропускали по 10 мл РСО. После прохождения всего объема извлечения продолжали кондиционировать 70% этанол в количестве 20 мл. Полученный элюат упаривали при комнатной температуре при разрежении 0,08 мПа. Сухой остаток растворяли при встряхивании в 10 мл подвижной фазы. Затем содержимое каждой микроколонки центрифугировали 15 мин при $g = 1000–1500$. Из надосадочной жидкости форми-

ровали пробы для введения в хроматограф.

Методика определения оптимального количества оксида алюминия для достижения приемлемых результатов при интерпретации результатов анализа. В стеклянные флаконы (10 шт) помещали по 10 мл водно-спиртового извлечения листьев левзеи сафлоровидной. Затем в эти же флаконы добавляли различные количества оксида алюминия (от 0 до 5000 мг с шагом в 500 мг). Из надосадочной жидкости отбирали по 1 мл, высушивали при комнатной температуре при разрежении 0,08 мПа. Каждую из проб перерастворяли в 1 мл подвижной фазы, центрифугировали 15 мин при $g = 1000-1500$, отбирали супернатант и формировали пробы для введения в хроматограф.

Методика определения степени сорбции 20Е оксидом алюминия в присутствии компонентов матрицы. В одиннадцать стеклянных флаконов помещали по 10 мл РСО, высушивали при комнатной температуре при разрежении 0,08 мПа. Затем в те же флаконы помещали по 10 мл водно-спиртовых извлечений листьев левзеи сафлоровидной, а также помещали по 3,5 г оксида алюминия.

Флаконы инкубировали при комнатной температуре при периодическом перемешивании в течение суток. Затем содержимое каждого флакона центрифугировали

15 мин при $g = 1000-1500$. Из надосадочной жидкости отбирали по 1 мл, высушивали при комнатной температуре при разрежении 0,08 мПа. Затем каждую из проб перерастворяли в 1 мл подвижной фазы, формировали пробы для введения в хроматограф и анализировали методом ВЭЖХ.

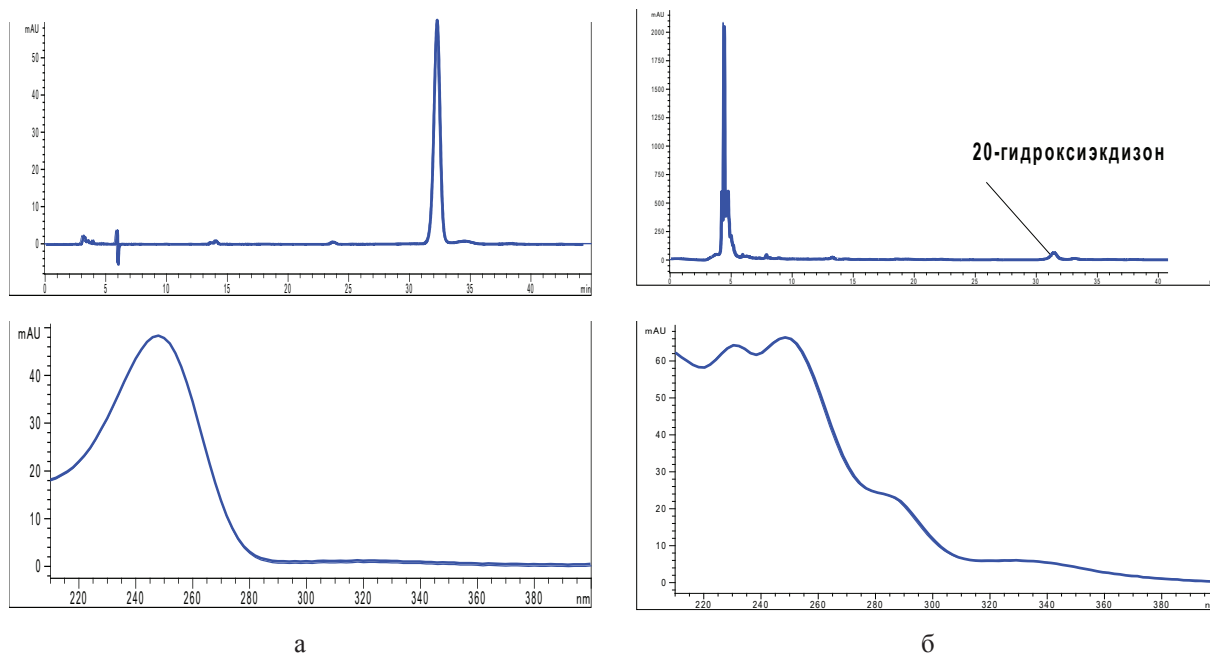
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе определения количества элюента для вытеснения остаточного объема исследуемого образца в колонке было установлено, что один грамм алюминия оксида удерживает $0,56 \pm 0,1$ г элюента. Это учитывалось при приготовлении образцов.

Изменение состава подвижной фазы и режима хроматографирования (температуры, скорости подачи ПФ) не привело к приемлемому результату, хотя и способствовало улучшению результата (рисунок 3).

Результаты исследования УФ-спектров зон поглощения 20-гидроксиэкдизона при внесении различных количеств алюминия оксида в исследуемых образцах представлены на рисунке 4.

Как видно из рисунка 4, УФ-спектр зоны поглощения 20Е после очистки пробы оксидом алюминия практически совпадает с УФ-спектром стандартного образца 20-гидроксиэкдизона.



а – стандартный образец, б – испытуемый образец

Рисунок 3 – Хроматограммы и УФ-спектры растворов стандартного и испытуемого образцов 20Е при измененных условиях хроматографирования

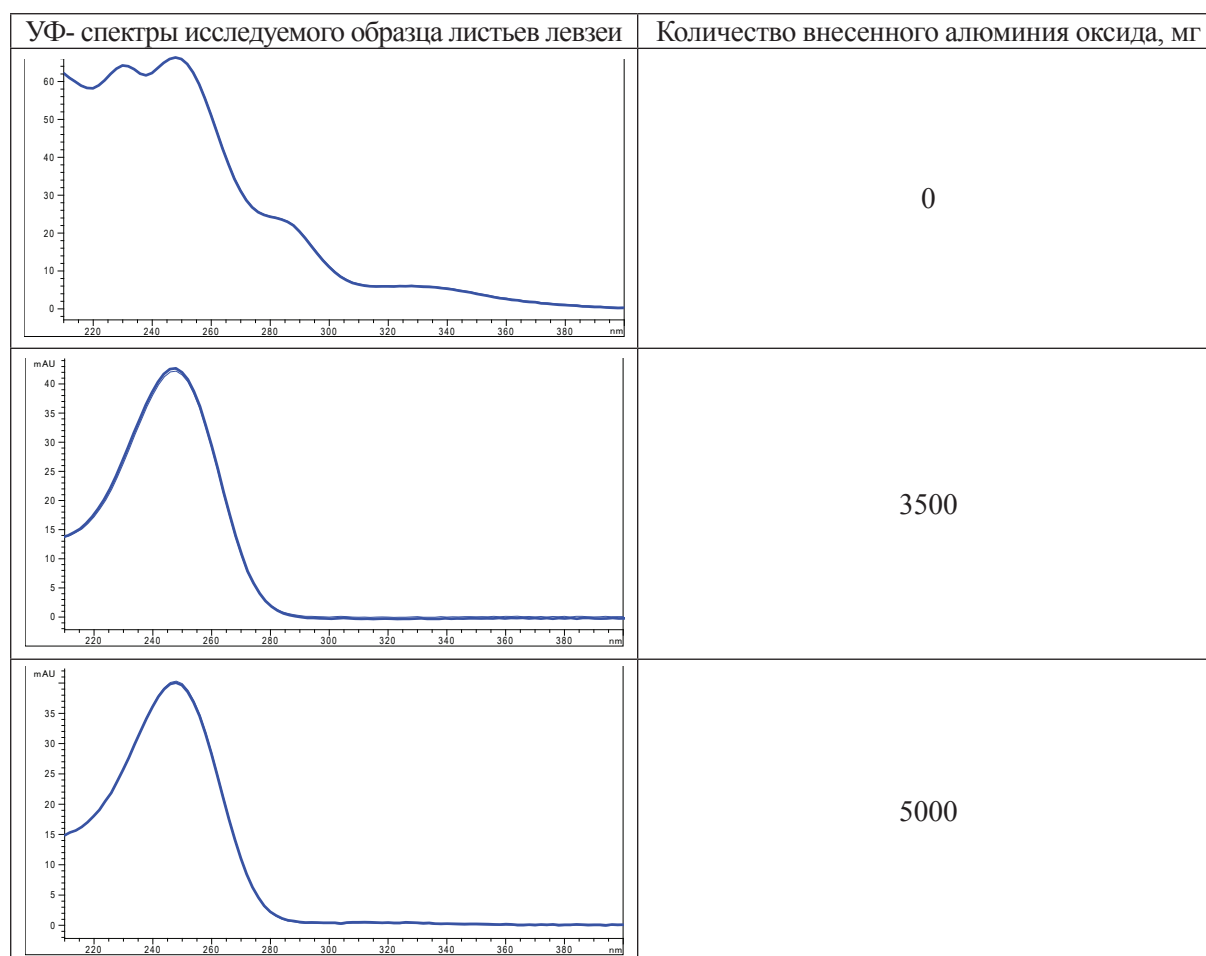


Рисунок 4 – УФ-спектры зон поглощения 20-гидроксиэкдизона при внесении различных количеств алюминия оксида

Внесение алюминия оксида в количестве до 3,5 г позволило в нашем случае достичь приемлемой спектральной чистоты 20Е. Таким образом, соотношение между количеством сорбента и объемом извлечения составило 3,5:10 (м/об).

Оценку влияния компонентов матрицы на сорбцию 20Е алюминия оксидом проводили путем введения в раствор РСО 20Е разных количеств сопутствующих примесей. Известно, что на поздних стадиях вегетации в листьях левзеи содержание 20Е значительно снижается [3, 14]. Поэтому в

качестве источника примесей использовали экстракты из листьев левзеи поздних сроков заготовки (сентябрь–октябрь), в которых 20Е практически отсутствует (по результатам ТСХ [15] и ВЭЖХ анализа), но содержание примесей максимально. Результаты исследования приведены в таблице 1.

Как видно из приведенных данных, сорбция 20Е в присутствии компонентов матрицы незначительна, и ею можно пренебречь.

При изучении степени сорбции чистого 20Е алюминия оксидом были получены следующие результаты (таблица 2).

Таблица 1 – Влияние компонентов матрицы на сорбцию 20Е алюминия оксидом

№ пробы	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Количество примесей, %	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	0
Введено РСО 20Е, мкг/мл	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Найдено 20Е	105,3	100,7	101,1	99,6	103,9	98,4	103,5	106,6	106,9	103,9	101,3
Сорбция 20Е, %	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Примечание: за 100 % примесей взято максимальное количество примесей, которое было обнаружено в ЛРС.

Таблица 2 – Степень сорбции 20Е на алюминия оксиде

№ колонки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Количество алюминия оксида, мг	0	500	1000	1500	2000	2500	3000	3500	4000	4500	5000
Введено РСО 20Е, мкг/мл	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Найдено 20Е	100,4	99,3	102,3	100,7	100,6	100,3	102,5	97,9	101,2	100,0	102,0
Степень сорбции, в %	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,1	0,0	0,0	0,0

Примечание: для каждой колонки площади пиков рассчитывали как среднее значение пяти измерений.

Как видно из таблицы 2, сорбция 20Е незначительна, и ею также можно пренебречь.

ВЫВОДЫ

Разработана методика твердофазной очистки водно-спиртового извлечения листьев левзеи сафлоровидной при помощи оксида алюминия. Методика позволяет устранить искажающее влияние примесей на результаты количественного определения 20Е в листьях левзеи, а также применять различные количества алюминия оксида сообразно необходимости. Методика может быть применена для стандартизации лекарственного растительного сырья левзеи сафлоровидной и лекарственных средств на ее основе.

SUMMARY

A. A. Karusevich, G. N. Buzuk
APPLICATION OF ALUMINIUM
OXIDE IN THE PURIFICATION
OF WATER-ALCOHOL EXTRACTION
FROM RHAPONTICUM
CARTHAMOIDES LEAVES

During the validation of methods for determining 20-hydroxyecdysone in leaves of *Rhaponticum carthamoides* we found out that related substances that absorb in the wavelength range 230-250 nm hamper the analysis. Analysis of the absorption spectrum allowed to assume that these substances have phenolic nature. To eliminate the distorting effect of impurities on the results of the quantitative determination of 20-hydroxyecdysone, solid phase extraction column of aluminium oxide was used.

Keywords: 20-hydroxyecdysone, solid phase extraction, HPLC, *Rhaponticum Carthamoides*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фитоэкдистероиды / Л. И. Алексеева [и др.]; под общ. ред. В.В. Володина. –

СПб.: Наука, 2003. – 293 с.

2. Фитоэкдистероиды – растительные аналоги гормонов линьки насекомых / В. В. Володин [и др.] // Растительные ресурсы. – 2004. – Вып. 2. – С. 1–18.

3. Вересковский, В. В. Левзея – перспективное лекарственное, пищевое и кормовое растение / В. В. Вересковский. – Минск: Наука и техника, 1992. – 64 с.

4. Рапontiкум сафлоровидный – *Rhaponticum carthamoides* // Лекарственные растения Государственной фармакопеи. Лекарственные растения, разрешенные для производства ГЛС. М.: 2001. – С. 369–373.

5. Тимофеев, Н. П. Накопление и сохранность 20-гидроксиэкдизона в лекарственном сырье левзеи / Н. П. Тимофеев // Материалы I Российской научно-практической конференции «Актуальные проблемы инноваций в создании фитопродуктов на основе нетрадиционных растительных ресурсов и их использование в фитотерапии». – [Электронный ресурс]. – 2001. – Режим доступа: http://chem.kstu.ru/butlerov_comm/vol2/cd-a2/data/jchem&cs/russian/n5/1vr25/25.htm. – Дата доступа: 10.01.2016.

6. Пчеленко, Л. Д. Адаптогенный эффект экдистероидсодержащей фракции *Serratula Coronata* L. / Л. Д. Пчеленко, Л. Г. Метелкина, С. О. Володина // Химия растительного сырья. – 2002. – № 1. – С. 69–80.

7. Зарембо, Е. В. Содержание 20-гидроксиэкдизона в видах родов *Raponticum* Ludw. и *Serratula* L. флоры Дальнего Востока России / Е. В. Зарембо, Л. И. Соколова, П. Г. Горовой // Растительные ресурсы. – 2001. – № 3. – С. 59–64.

8. Алексеева, Л. И. Метод концентрирования минорных гидрофобных эдистероидов с использованием фронтальной хроматографии / Л. И. Алексеева, В. В. Володин, В. Г. Лукша // Растительные ресурсы. – 2000. – № 4. – С. 122–127.

9. Куренкова, С. В. Продуктивность и химический состав *Rhaponticum carthamoides* (Willd.), выращиваемого в республике Коми / С. В. Куренкова, Г. Н. Табаленкова // Растительные ресурсы. – 2000. – № 2. – С. 14–23.

10. Экдистероиды в культурах клеток *Serratula coronata* и *Ajuga reptans* / В.Н. Филиппова [и др.] // Химия растительного сырья. – 2002. – № 1. – С. 57–62.

11. Карусевич, А. А. Идентификация и количественное определение 20-гидроксиэкдизона в листьях левзеи сафлоровидной методом ВЭЖХ / А. А. Карусевич, Д. В. Моисеев, Г. Н. Бузук // Вестник фармации. – 2007. – № 3 (37). – С. 55–59.

12. Куркина, А. В. Флавоноиды фармакопейных растений / А. В. Куркина. – Самара : ООО «Офорт», 2012. – 290 с.

13. Государственная фармакопея Республики Беларусь (ГФ РБ II): В 2 т. Т.1. Общие методы контроля качества лекарственных средств / УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»; под общ. ред. Шерякова А.А. – Молодечно: Победа, 2012. – 1220 с.

14. Карусевич, А. А. Изучение динамики накопления 20-гидроксиэкдизона и определение времени заготовки листьев левзеи сафлоровидной / А. А. Карусевич, Д. В. Моисеев, Г. Н. Бузук // Вестник фармации. – 2008. – № 1 (39). – С. 24–28.

15. Карусевич, А. А. Использование оксида алюминия при идентификации 20-гидроксиэкдизона в листьях левзеи сафлоровидной с помощью тонкослойной хроматографии / А. А. Карусевич, Г. Н. Бузук // Вестник фармации. – 2011. – № 4 (54). – С. 5–12.

Адрес для корреспонденции:

210023, Республика Беларусь,
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27,
УО «Витебский государственный
ордена Дружбы народов
медицинский университет»,
кафедра фармакогнозии
с курсом ФПК и ПК,
тел. раб.: 8(0212) 37-09-29,
Бузук Г.Н.

Поступила 13.01.2016 г.

С. Э. Ржеусский, В. В. Кугач

СТАБИЛЬНОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ ВАГИНАЛЬНЫХ СУППОЗИТОРИЕВ С НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА

Витебский государственный орден Дружбы народов медицинский университет

В статье представлены результаты исследования стабильности опытно-промышленных серий суппозиториев с наночастицами серебра и безопасности их применения. В работе использовали методы фармацевтико-технологических испытаний, биологический метод определения минимальной ингибирующей и минимальной бактерицидной концентрации, а также метод атомно-эмиссионного определения металлов в биологических объектах.

Установлено, что методика определения подлинности повидаргола в суппозиториях является специфичной и робастной при изменении объема реактивов (кислоты хлористоводородной Р1 в пределах $0,3 \pm 0,05$ мл, раствора аммиака разведенного Р1 в пределах $3,0 \pm 0,5$ мл, раствора аммиака Р в пределах 15 ± 3 мл и раствора формальдегида Р в пределах 23 ± 5 капель), времени центрифугирования и воздействия ультразвука (15 ± 3 минуты). Доказано, что на результаты количественного определения повидаргола в суппозиториях не оказывает влияния изменение объема растворителя (24 ± 5 мл), кислоты азотной (5 ± 1 мл) и времени воздействия ультразвука (15 ± 3 минуты).

Показано, что в процессе хранения в течение 12 месяцев остаются неизменными показатели микробиологической стабильности и качественных реакций на фармацевтическую субстанцию. Статистически значимо не изменяются время распадаемости, однородность дозирования, количественное содержание повидаргола и антимикробная активность лекарственного средства. Незначительными являются изменения цвета и средней массы суппозиториев.